CZU: 615.322:638.135 **https://doi.org/10.59295/sum1(171)2024_29**

CONȚINUTUL TOTAL DE POLIFENOLI ȘI ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A EXTRACTELOR ETANOLICE DE PROPOLIS

Carolina GRIGORAȘ, Maria GONȚA,
Universitatea de Stat din Moldova

Propolisul este un produs secundar apicol cu un conținut înalt de polifenoli ce manifestă acțiune antioxidantă. În articolul dat a fost realizat studiul comparativ al rezultatelor obținute privind conținutul total de polifenoli din extractele de propolis și activitatea antioxidantă a acestora în funcție de unii factori: concentrația solventului, metoda de extracție. Conținutul total de polifenoli a fost determinat prin metoda Folin-Ciocâlteu, iar activitatea antioxidantă prin metoda DPPH. Analiza datelor a relevat că conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă depinde, în mare parte, de concentrația solventului, iar concentrația optimă pentru obținerea extractelor etanolice de propolis cu un conținut înalt de polifenoli, este de 70%.

Cuvinte-cheie: *propolis, extract, macerare, extracție cu ultrasunet, polifenoli, metoda Folin-Ciocâlteu, metoda DPPH.*

TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHANOLIC PROPOLIS EXTRACTS

Propolis is a beekeeping by-product with a high content of polyphenols that manifests antioxidant action. In this article was conducted the comparative study of the obtained results regarding the total polyphenol content of propolis extracts and their antioxidant activity depending on several factors: solvent concentration, extraction method. The total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity by the DPPH method. The analysis of the data revealed that the total polyphenol content and antioxidant activity is largely depended by the solvent concentration, optimal for obtaining ethanolic extracts of propolis with a high content of polyphenols, being ethyl alcohol with a concentration of 70%.

Keywords: *propolis, extract, maceration, ultrasound extraction, polyphenols, Folin-Ciocalteau method, DPPH method.*

Introducere

Propolisul este unul dintre cele mai cunoscute produse apicole, folosit în medicina populară încă din cele mai vechi timpuri pentru numeroasele sale efecte terapeutice asupra sănătății: antimicrobiene, antifungice, antivirale, anticanceroase, antidiabetice, antioxidante ș.a. În prezent, este o materie primă frecvent utilizată pentru fabricarea diferitelor extracte care pot servi ca ingrediente active în industria farmaceutică.

Propolisul brut este un amestec natural, colectat de albine, din muguri de flori și frunze ale diferitelor specii de plante. În general, propolisul constă din 50% rășini vegetale, 30% ceară de albine, 10% uleiuri esențiale, 5% polen și 5% impurități. Compușii organici care au fost identificați în propolis sunt: polifenoli, terpene, esteri, aminoacizi, vitamine, minerale și hidrați de carbon [1,2].

Profilul molecular bioactiv al propolisului brut variază în funcție de originea geografică și botanică, anotimp, genetica albinelor și a factorilor de mediu. Calitatea și cantitatea propolisului colectat depind de diversitatea și disponibilitatea plantelor, de sursa și timpul recoltării, de tehnicile și practicile apicultorilor, cât și de starea ecologică a mediul ambiant [1].

Compușii bioactivi prezenți în propolis au proprietatea de a neutraliza radicalii liberi destul de eficient, ceea ce face ca propolisul să fie o sursă promițătoare de antioxidanți naturali cu activitate antioxidantă înaltă [3]. Antioxidanții au o importanță mare pentru organism în scopul combaterii radicalilor liberi. Astfel studiul activității antioxidante a extractului de propolis este important [2].

Profilul chimic al extractelor de propolis depinde, de asemenea, de tipul de solvent utilizat pentru extracție, raportul de solvenți și materie primă și metodele de extracție. În total, există peste 500 de compuși

bioactivi identificați în propolis, iar majoritatea sunt metaboliți secundari ai plantelor. Deși polifenolii sunt un grup destul de divers, ei au multe asemănări, iar farmacologia propolisului este în mare parte rezultatul activității și interacțiunii lor. Compușii biologic activi din propolisul brut sunt de obicei extrași cu utilizarea solvenților precum etanolul (EtOH), glicerol sau apă [4].

Metode și materiale

Reactivi chimici de calitate pură pentru analiză: alcool etilic 96%, reactiv Folin-Ciocâlteu VWR Chemicals, acid galic SIGMA Aldrich, carbonat de sodiu, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)SIGMA Aldrich.

Materia primă (propolisul brut) a fost colectată în septembrie 2023, de la coloniile de albine localizate în satul Mihailovca, raionul Cimișlia. Probele de propolis brut au fost apoi păstrate la loc rece în vase întunecate pentru a preveni fotodegradarea, înainte de investigarea ulterioară.

Metodologia de obținere a extractului de propolis

Procesul de obținere a extractelor de propolis a fost constituit din următoarele etape:

1. selectarea propolisului care la examinarea organoleptică nu a prezentat aspect lucios, impurități sau alte semne de degradare;
2. mărunțirea blocurilor de propolis pentru a mări suprafața de contact cu solventul, facilitând extracția;
3. extracția prin macerarea cu alcool etilic de 60-80% în raportul materie primă (g) – solvent (mL) de 1:10, timp de 10 zile, în vas de sticlă de culoare închisă, la temperatura camerei prin agitare periodică, iar după 10 zile extractul a fost filtrat în scopul separării reziduurilor nedizolvate;
4. extracția cu ultrasunet cu alcool etilic de 60-80% în raportul materie primă (g) – solvent (mL) de 1:10, timp de 30 minute la 25 kHz, temperatura de 40 °C. Extractele obținute au fost centrifugate la 8800 rpm, timp de 10 minute, ulterior filtrate și plasate pentru 12 ore la 4°C, după care extractele au fost centrifugate și filtrate repetat.

Toate tipurile de extracte au fost preparate în trei repetări [1,5].

Determinarea conținutului total de polifenoli prin metoda Folin-Ciocâlteu

Probele de analizat ale extractelor de propolis au fost obținute prin diluția a 25 µL extract în balon cotat de 10 mL și aduse până la cotă cu solventul utilizat la extracție (EtOH 60-80%). Prepararea soluțiilor de analizat:

1. soluția de analizat: în eprubetă au fost transferați 7,5 mL apă distilată, 0,5 mL reactiv Folin-Ciocâlteu, 0,5 mL extract diluat;
2. soluția de analizat pentru curba de etalonare: în eprubetă au fost transferați 7,5 mL apă distilată, 0,5 mL reactiv Folin-Ciocâlteu, 0,5 mL soluție etalon a acidului galic 40-200 mg/L (preparate prin diluția soluției stoc standard cu concentrația 1g/L);
3. soluția martor: în eprubetă au fost transferați 7,5 mL apă distilată, 0,5 mL reactiv Folin-Ciocâlteu, 0,5 mL apă distilată.

Conținutul fiecărei eprubete a fost agitat și lăsat în repaus timp de 6 minute. Ulterior în fiecare eprubetă a fost adaugat 1,5 mL soluție de carbonat de sodiu 20% și a fost agitat riguros. S-a introdus eprubetele, în termostat pentru 120 min, la 30 ±2°C. Absorbanța soluțiilor a fost măsurată la 765 nm, față de soluția martor. Conținutul total de polifenoli a fost calculat, folosind curba de etalonare pentru acidul galic (standard de referință), în limita de concentrații de la 40 la 200 mg/L [5,6].

Conținutul total de polifenoli a fost exprimat în mg echivalenți de acid galic la g extract de propolis (mg GAE/g), conform următoarei formule de calcul:

Conținutul total de polifenoli (mg GAE/g) = (GAC × V × FD × 100)/(m×(100-w) (1),

unde: GAC = concentrația acidului galic din curba de etalonare (mg/mL); V = volumul probei (mL); FD = factor de diluție a probei; m= greutatea probei (g); w= umiditatea (%) [7].

Determinarea activității antioxidante

Activitatea de captare a radicalilor prin metoda DPPH se bazează pe transferul de electroni antioxidanți

și neutralizarea radicalului DPPH. Reacția este însoțită de decolorarea soluției de DPPH, cu maximul de absorbție la 517 nm, iar gradul de decolorare este un indicator al activității antioxidante [8].

Absorbanța amestecului constituit din probă și soluția de DPPH a fost înregistrat pe un spectrofotometru (T70 UV/VIS) la lungimea de undă de 517 nm față de soluția martor corespunzătoare, timp de 60 minute, la diferite intervale de timp 1; 3; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60 min. Pentru a determina absorbanța soluției (λ=517 nm) în cuvă au fost transferați 3,3 mL soluție DPPH (A=0,700±0,002) și 0,7 mL soluție de extract etanolic de propolis (EEP) diluat (FD=2000). Procentul de captare a radicalilor DPPH este calculat după ecuația (2):

Activitatea antioxidantă (AA%)= $\frac{(A_{martor}-A_{probă})}{A_{martor}}\times 100$ (2),

unde: A_{martor} este absorbanța soluției de DPPH și $A_{probă}$ este absorbanța soluției de analizat cu DPPH după 60 minute [9].

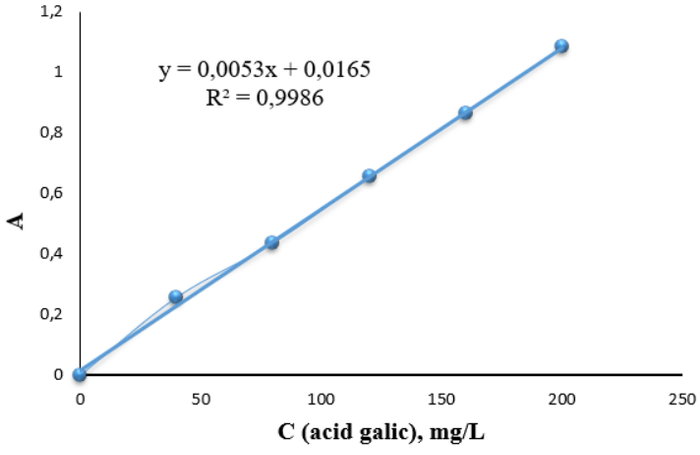
Rezultate și discuții

Au fost obținute 18 extracte etanolice de propolis (EEP), nouă extracte cu volumul de 50 mL fiecare cu un conținut de ±5,0000 g propolis brut mărunțit și solvent EtOH 60-80% și nouă extracte a câte 10 mL obținute prin extracție cu ultrasunet cu un conținut de ±1,0000 g propolis brut mărunțit și solvent EtOH 60-80%.

Determinarea conținutului total de polifenoli

Polifenolii din EEP obținute în prealabil, reacționează cu reactivul Folin-Ciocâlteu în prezența carbonatului de sodiu și formează un complex albastru. Intensitatea culorii albastre este proporțională cu cantitatea de compuși fenolici reactivi din probă. Conținutul polifenolic se determină prin măsurarea absorbanței soluției de analizat la 765 nm, rezultatele sunt calculate în baza curbei de etalonare (Figura 1) și formula de calcul (1), acestea sunt prezentate în Tabelul 1.

Fig. 1. Curba de etalonare pentru acidul galic.

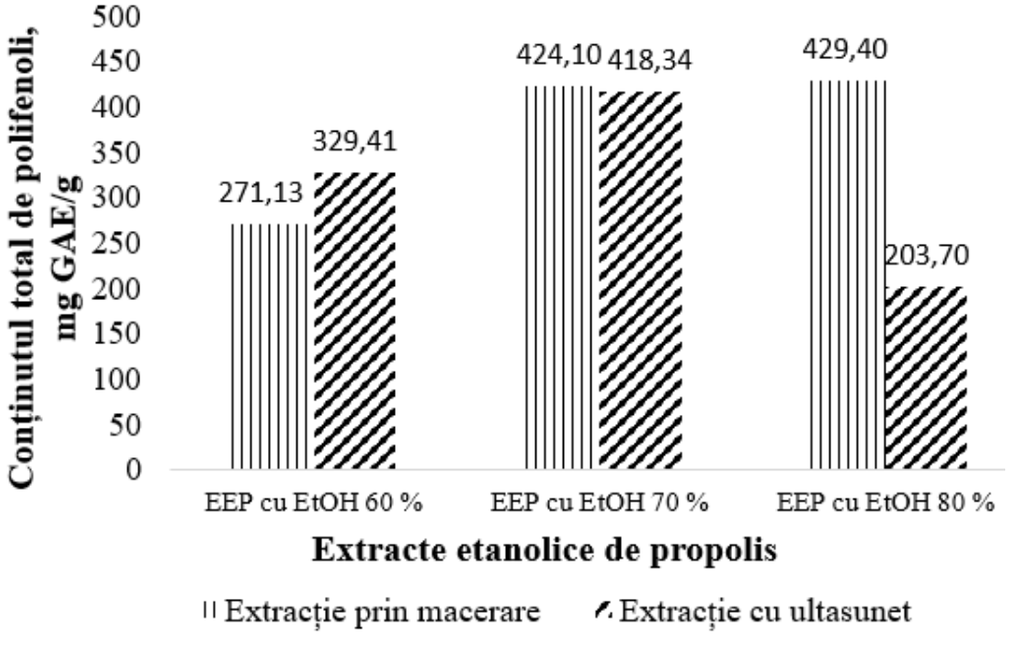


Tabelul 1. Conținutul total de polifenoli în extractele de propolis analizate.

Soluția de analizat	A_{765}	Concentrația calculată din curba de etalonare, mg/mL	Conținutul total de polifenoli, mg GAE/g
Extractele obținute prin macerare			
EEP_1-EtOH 60%	0,369	66,51	271,13±14,26
EEP_2-EtOH 60%	0,349	62,74	
EEP_3-EtOH 60%	0,388	70,09	
EEP_1-EtOH 70%	0,570	104,43	424,10±6,26
EEP_2-EtOH 70%	0,557	101,98	
EEP_3-EtOH 70%	0,575	105,38	

EEP_1-EtOH 80%	0,601	110,28	429,40±17,75
EEP_2-EtOH 80%	0,561	102,74	
EEP_3-EtOH 80%	0,558	102,17	
Extractele obținute prin aplicarea ultrasunetului			
EEP_1-EtOH 60%	0,407	73,68	329,41±22,45
EEP_2-EtOH 60%	0,460	83,68	
EEP_3-EtOH 60%	0,458	83,30	
EEP_1-EtOH 70%	0,540	98,77	418,34±12,18
EEP_2-EtOH 70%	0,560	102,55	
EEP_3-EtOH 70%	0,573	105,00	
EEP_1-EtOH 80%	0,287	51,04	203,70±33,17
EEP_2-EtOH80%	0,233	40,85	
EEP_3-EtOH 80%	0,319	57,08	

Fig. 2. Conținutul total de polifenoli a extractelor de propolis analizate.



Conținutul total de polifenoli analizat în extractele etanolice de propolis variază de la 203,70 până la 429,40 mg GAE/g în funcție de concentrația solventului utilizat, metoda de extracție aplicată, condițiile de extracție și dimensiunea particulelor de propolis brut utilizat. Analiza datelor prezentate în Tabelul 1 și Figura 2 relevă că concentrația EtOH de 70% este cea mai optimă, pentru extragerea compușilor polifenolici pentru ambele metode de extracție.

Deși conținutul total de polifenoli în cazul extracției cu EtOH de 80% la macerare este mai mare și constitue 429,40 mg GAE/g, această diferență este nesemnificativă față de conținutul total de polifenoli în cazul extractelor de propolis cu EtOH de 70% obținute prin ambele metode. În același timp cel mai mic conținut total de polifenoli a fost identificat în extractul de propolis cu EtOH de 80% la extracția cu ultrasunet, ceea ce poate fi explicat prin faptul că condițiile de extracție și concentrația solventului utilizat au dus la degradarea anumitor compuși polifenolici.

Determinarea activității antioxidante

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2 și Tabelul 3. Punctul zero se determină adăugând în cuvă 3,3 mL soluție DPPH și 0,7 mL de alcool etilic de concentrația utlizată pentru extracție.

Tabelul 2. Variația în timp a absorbanței soluției ce conține DPPH la interacțiunea cu extractul etanolic de propolis obținut la macerare.

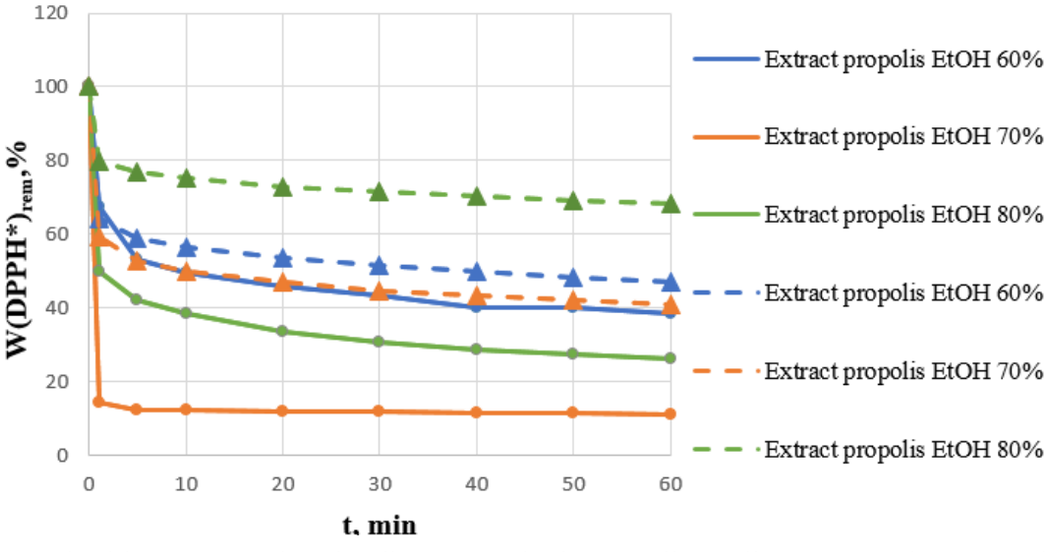
Timpul, min	0	1	5	10	20	30	40	50	60
Extract de propolis cu EtOH 60%									
A_{517} EEP_1	0,531	0,370	0,324	0,298	0,268	0,248	0,233	0,222	0,207
A_{517} EEP_2	0,531	0,365	0,256	0,254	0,252	0,252	0,252	0,252	0,251
A_{517} EEP3	0,531	0,340	0,270	0,236	0,211	0,195	0,169	0,168	0,157
A_{517} medie	0,531	0,358	0,283	0,262	0,243	0,231	0,214	0,214	0,205
AA,%		32,58	46,69	50,66	54,23	56,50	59,70	59,70	61,40
$W(DPPH^*)_{rem}$,%	100	67,42	53,29	49,34	45,76	43,50	40,30	40,30	38,60
Extract de propolis cu EtOH 70%									
A_{517} EEP_1	0,567	0,075	0,067	0,064	0,063	0,062	0,062	0,061	0,061
A_{517} EEP_2	0,567	0,078	0,065	0,063	0,061	0,061	0,061	0,061	0,060
A_{517} EEP_3	0,567	0,091	0,084	0,083	0,079	0,079	0,077	0,077	0,072
A_{517} medie	0,567	0,081	0,072	0,070	0,067	0,067	0,066	0,066	0,064
AA,%		85,71	87,30	87,65	88,18	88,18	88,36	88,36	88,71
$W(DPPH^*)_{rem}$,%	100	14,29	12,30	12,35	11,82	11,82	11,64	11,64	11,29
Extract de propolis cu EtOH 80%									
A_{517} EEP_1	0,565		0,277	0,256		0,211	0,199	0,190	0,188
A_{517} EEP_2	0,565		0,238	0,217		0,174	0,160	0,148	0,139
A_{517} EEP_3	0,565		0,201	0,175		0,139	0,131	0,125	0,121
A_{517} medie	0,565		0,238	0,216		0,174	0,163	0,154	0,149
AA,%			57,88	61,77		69,20	71,15	72,74	73,63
$W(DPPH^*)_{rem}$,%	100		42,12	38,23		30,80	28,85	27,26	26,37

Tabelul 3. Variația în timp a absorbanței soluției ce conține DPPH la interacțiunea cu extractul etanolic de propolis obținut prin extracție cu ultrasunet.

Timpul, min	0	1	5	10	20	30	40	50	60
Extract de propolis cu EtOH 60%									
A_{517} EEP_1	0,572	0,363	0,335	0,321	0,303	0,292	0,282	0,273	0,265
A_{517} EEP_2	0,572	0,365	0,334	0,320	0,302	0,292	0,283	0,275	0,268
A_{517} EEP3	0,572	0,374	0,346	0,332	0,315	0,304	0,293	0,285	0,277
A_{517} medie	0,572	0,367	0,338	0,324	0,306	0,296	0,286	0,277	0,270
AA,%		35,84	40,91	43,35	46,50	48,25	50,00	51,57	52,80
$W(DPPH^*)_{rem}$,%	100	64,16	59,09	56,64	53,50	51,75	50,00	48,43	47,20
Extract de propolis cu EtOH 70%									
A_{517} EEP_1	0,567	0,356	0,327	0,313	0,297	0,285	0,277	0,269	0,261
A_{517} EEP_2	0,567	0,418	0,400	0,389	0,378	0,369	0,363	0,357	0,351
A_{517} EEP_3	0,567	0,239	0,174	0,149	0,125	0,110	0,099	0,092	0,086
A_{517} medie	0,567	0,337	0,300	0,283	0,266	0,254	0,246	0,239	0,232
AA,%		40,56	47,09	50,09	53,09	55,20	56,60	57,85	59,08
$W(DPPH^*)_{rem}$,%	100	59,44	52,91	49,91	46,91	44,80	43,40	42,15	40,92

Extract de propolis cu EtOH 80%									
A_{517} EEP_1	0,541		0,409	0,402		0,379	0,372	0,366	0,360
A_{517} EEP_2	0,541		0,436	0,428		0,411	0,405	0,399	0,394
A_{517} EEP_3	0,541		0,407	0,396		0,373	0,366	0,359	0,353
Absorbanța medie	0,541		0,417	0,408		0,387	0,381	0,374	0,369
AA,%			22,92	24,58		28,47	29,57	30,87	31,79
$W(DPPH^*)_{rem}$,%	100		77,08	75,42		71,53	70,43	69,13	68,21

Fig. 3. Curbele cinetice de consum a DPPH-lui (%) (cu linii sunt prezentate curbele cintice pentru extractele obținute prin macerare, iar cu linii întrerupte sunt prezentate curbele cinetice pentru extractele obținute prin extracție cu ultrasunet).



Activitate antioxidantă cea mai înaltă din extractele de propolis analizate o posedă extractul de propolis cu EtOH 70% obținut prin macerare, ceea ce poate fi confirmat prin analiza curbelor cinetice de consum a DPPH-ului în timp Figura 3, astfel cu cât conținutul remanent de DPPH este mai mic cu atât activitatea antioxidantă este mai mare.

Concluzii

Analiza datelor conținutului total de polifenoli exprimați în mg GAE/g relevă că alcoolul etilic cu concentrația de 70% este solventul optim utilizat pentru a extrage compușii polifenolici prin ambele metode de extracție. Activitatea antioxidantă este cea mai pronunțată în cazul extractului de propolis cu concentrația alcoolului etilic de 70% obținut prin macerare AA_{60min}=88,71%, iar pentru extractul obținut prin extracție cu ultrasunet AA_{60min}=59,08%, astfel ambele metode de extracție pot fi utilizate pentru a obține extract etanolic de propolis cu un conținut sporit de polifenoli și activitate antioxidantă înaltă. Pentru utilizarea ulterioară a extractului de propolis ca ingredient activ a unui produs cosmetic sau farmaceutic se recomandă standardizarea acestuia.

Referințe:

1. ŠURAN, J., CEPANEC, I., MASEK, T., RADIC, B., RADIC, S., TLAK, G.I., VLAINIC, J. *Propolis Extract and Its Bioactive Compounds-From Traditional to Modern Extraction Technologies.* In: *Molecules*, 2021, Vol. 26(10): 2930, p.1-2. DOI: 10,3390/molecules26 102930
2. SYED SALLEHSNA, M. HANAPIAH, N., AHMAD, H., WAN JOHARI, W. L., OSMAN, N. H., MAMAT, M. R. *Determination of Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity and GC-MS Analysis of Malaysian Stingless Bee Propolis Water Extracts.* In: *Scientifica (Cairo)*, 2021, p.1-2. DOI:10.1155/2021/3789351

3. PAZIN, W. M., MONACO, EGEA SOARES, A. E., MIGUEL, F. G., BERRETTA, A. A., ITO, A. S.*Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types.* In: *Journal of Apicultural Research,* 2017, Vol. 56 (1), p.40–49. DOI: https://doi. org/10.1080/00218839.2016.1263496
4. GALEOTTI, F., MACCARI, F., FACHINI, A., VOLPI, N. *Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvent Useful for Finished Products*. In: *Foods,* 2018, Vol. 7(3), p. 41. DOI: https://doi.org/10. 3390/foods7030041
5. CIOBANU, C., GURANDA, D., CIOBANU, N., COJOCARU-TOMA, M., SOLONARI, R. *Obținerea și determinarea activității antioxidante a extractelor polifenolice din propolis.* În: *Sănătate Publică, Economie şi Management în Medicină,* 2021, Vol. 2(89), p. 4-8. ISSN 1729-8687. DOI: doi.org/10.52556/2587-3873.2021.2(89).01
6. KUPINA, S., FIELDS, C., ROMAN, M. C., BRUNELLE, S. L.*Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017*. Vol. 13. In*: Journal of AOAC International* 2019. DOI: 10.5740/jaoacint.2017.13
7. GONZALEZ-MONTIEL, L., FIGUEIRA, A. C., MEDINA-PEREZ, G., FERNANDEZ-LUQUENO, F., AGUIRRE-ALVAREZ, G., PEREZ-SOTO, E., PEREZ-RIOS, S., CAMPOS-MONTIEL, R. G. *Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Extracts during In Vitro Digestion.* In: *Applicated Science,* 2022, Vol. 12(15), 7892, p. 3. DOI: https://doi.org/10.3390/app12157892
8. MUNTEANU, I. G., APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. In: *International Journal of Molecular Science*. 2021. Vol. 22(7):3380. p.23.DOI: https://doi.org/10.3390/ijms22073380
9. ANNU, A. A., SHAKEEL, A. *Eco-friendly natural extract loaded antioxidative chitosan/polyvinyl alchohol based active films for food packaging*. In: *Heliyon*, 2021, Vol. 7(3), p. 3. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06550

Date despre autori:
Carolina GRIGORAŞ, doctorandă, Școala Doctorală Științe Biologice, Geonomice, Chimice și Tehnologice, Universitatea de Stat din Moldova.
ORCID: 0009-0006-7123-7453
E-mail: carolina.grigoras@usm.md

Maria GONȚA, dr. hab., prof. univ., Universitatea de Stat din Moldova.
ORCID: 0000-0003-3476-0967
E-mail: mvgonta@yahoo.com

Prezentat la 28.03.2024